

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
7. Jg., S. 374—378, Juli 1969

## Untersuchungen zum katabolen Mucopolysaccharid-Protein-Stoffwechsel in menschlichen Organen

Von D. PLATT<sup>1)</sup> und U. STEIN

*Medizinische Kliniken und Polikliniken der Justus-Liebig-Universität Gießen (Direktorium: Prof. Dr. H. J. Dengler, Prof. Dr. H. A. Kühn, Prof. Dr. H. G. Lasch) und Medizinische Klinik der Universität Freiburg (Direktorium: Prof. Dr. G. W. Löhr, Prof. Dr. W. Gerok)*

(Eingegangen am 5. Mai 1969)

In der vorliegenden Arbeit wurden in epithelialen und mesenchymalen Geweben vom Menschen die Aktivitäten der Glycosaminoglycano-Hydrolasen: Hyaluronidase,  $\beta$ -Glucuronidase und  $\beta$ -Acetylglucosaminidase und die der Peptidhydrolasen: Kathepsin D und saure Carboxypeptidase gemessen. Die höchsten Aktivitäten fanden sich in Thymus, Leber, Milz und Nebenniere. Geringe Aktivitäten wurden im subkutanen Bindegewebe und im Herzen gemessen. Die synergistische Wirkung der 5 lysosomalen Enzyme am Mucopolysaccharid-Proteinkomplex wurde diskutiert.

### *Studies on the Catabolic Mucopolysaccharide-Protein Metabolism in Human Organs*

In this investigation the activity of the glycosaminoglycan hydrolases: hyaluronidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -acetylglucosaminidase and the activity of the peptide hydrolases: cathepsin D and "acid" carboxypeptidase, were measured in human organs. The highest activities were found in the thymus, liver, spleen and suprarenal organ. Low activities were found in the connective tissue of the skin and in the heart. The synergistic mechanism of the five lysosomal enzymes on the mucopolysaccharidprotein complex was discussed.

Der Stoffaustausch zwischen Zelle und Blutgefäßsystem erfolgt stets durch die Interzellularsubstanz, die je nach Lokalisation und Funktion in ihrer Zusammensetzung quantitative und qualitative Unterschiede aufweist. Bei der chemischen Analyse findet man sulfatierte Polyuronide (Chondroitin-4-Sulfat, Chondroitin-6-Sulfat, Dermatan-sulfat und Heparitinsulfat), Polyuronide (Hyaluronsäure, Chondroitin), Polysulfate (Keratansulfat) und die Skleroproteide Kollagen und Elastin (1). Die Chondroitinsulfate liegen jedoch im Gewebe nicht in freier Form vor, sondern sind konvalent an Proteine gebunden. Nach MATHEW (2) ist im Rindernasenknochen eine zentrale Proteinkette mit bis zu 60 Chondroitinsulfatketten verbunden. Inzwischen konnten auch aus anderen Geweben Chondroitinsulfat-Proteinkomplexe nachgewiesen werden (4—6). Durch die Bindung der sauren Glycosaminoglycane an Proteine gewinnen die Chondroitinsulfate neue Eigenschaften, die im wesentlichen physiko-chemischer Natur sind. So bilden konzentrierte Chondroitinsulfat-Proteinlösungen durch Quer- und Längsverbindungen ein dreidimensionales Gitter, in dessen Innerem Wasser immobilisiert ist. FRIMMER und BUDDECKE (7) konnten an Modellversuchen zeigen, daß diesen Chondroitinsulfat-Proteinkomplexen eine wesentliche Bedeutung für Permeabilitätsvorgänge zukommt. Diese experimentellen Arbeiten weisen daraufhin, daß auch im lebenden Organismus den interzellulär gelegenen Chondroitinsulfat-Proteinkomplexen eine wichtige Aufgabe in der Steuerung des Transportmechanismus zur Zelle zukommt. Ein ungestörter Ablauf dieser Vorgänge ist jedoch nur dann möglich, wenn Synthese und Abbauvorgänge in einem Gleichgewicht stehen. Mittels radio-

aktiv markierter Substanzen (<sup>35</sup>SO<sub>4</sub>, <sup>14</sup>C-Acetat, <sup>14</sup>C-Glucose und <sup>14</sup>C-Serin) wurde die Synthese saurer Mucopolysaccharid-Proteinkomplexe untersucht (8—12).

In der vorliegenden Arbeit sollte nun versucht werden, den Aktivitätsnachweis derjenigen Enzyme zu erbringen, die am Abbau der Mucopolysaccharid-Proteinkomplexe beteiligt sind, um damit einen gewissen Einblick in den katabolen Mucopolysaccharid-Proteinstoffwechsel epithelialer und mesenchymaler menschlicher Gewebe zu gewinnen.

### Methodik

In 13 menschlichen — makroskopisch unauffälligen — Leichenorganen wurde die Aktivität der Hyaluronidase (systematischer Name: Hyaluronat-Glycanohydrolase, EC 3.2.1.35), in 14 Organen wurden die Aktivitäten der  $\beta$ -Glucuronidase (systematischer Name:  $\beta$ -D-Glucuronid-Glucuronohydrolase, EC 3.2.1.31) und  $\beta$ -Acetylglucosaminidase (systematischer Name:  $\beta$ -2-Acetamid-2-desoxy-D-glucosid-Acetamidohydrolase, EC 3.2.1.30), in 12 Organen wurde die Aktivität der „sauren“ Carboxypeptidase (EC 3.4.2.2)<sup>2)</sup> und in 9 dieser Organe die bei pH 3,2 optimal Hämoglobin-spaltende Kathepsin (EC 3.4.4.23)<sup>2)</sup> Aktivität gemessen.

Die Organproben wurden stets direkt nach der Sektion entnommen — pro Organgruppe durchschnittlich 25 Organproben — und zunächst bei —25° eingefroren. Die eingefrorenen Organe wurden durch einen elektrischen Fleischwolf gedreht, in der dreifachen Menge 0,1M Citrat-Puffer, pH 4,5 mit 0,15M NaCl + 0,1% Triton x-100 aufgenommen und unter Kühlung bei —20° (Methanolbad) mit einem Ultraturrax (Fa. Jahnke und Kunkel, Staufen, Brsg.) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat bei —25° eingefroren. Nach einem weiteren Auftau-Einfrierschritt wurde das Homogenat 20 Min. lang in der Kühlzentrifuge (+ 4°) bei 4000 g zentrifugiert und der Überstand einer

<sup>2)</sup> In der Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Comp., 2nd edition, Amsterdam 1965 enthaltenen Liste ist der systematische Name nicht verzeichnet.

<sup>1)</sup> Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

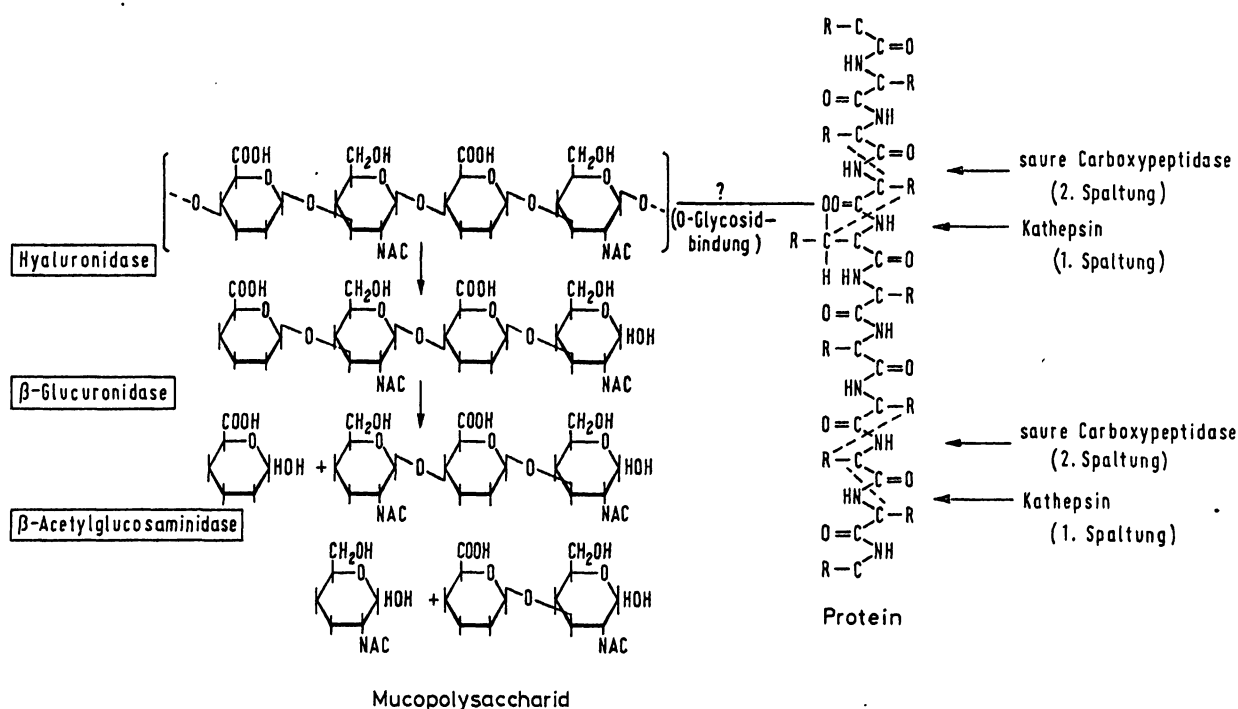


Abb. 1

Schematische Darstellung eines Mucopolysaccharid-Protein-Komplexes mit den spezifischen depolymerisierenden Enzymen

fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung unterworfen. Die jeweils durch Zentrifugieren gewonnene Fällung wurde in dest. Wasser aufgenommen und 2mal 24 Stdn. gegen dest. Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Alle Operationen wurden bei  $+4^{\circ}$  im Kühlraum durchgeführt. Die Enzymaktivitätsmessungen erfolgten im Homogenat und in den einzelnen Ammoniumsulfatfraktionen. Eine Anreicherung der sauren Carboxypeptidase aus Pankreasgewebe über die Ammoniumsulfatfällung hinaus erfolgte durch Gel-Filtration an in 0,2M NaCl-Lösung gequollenem und äquilibriertem Sephadex-G-150. Auf eine Säule von  $150 \times 1,5$  cm (Volumen: 265 ml) wurden 45 mg einer 11–30 Gew.-% Ammoniumsulfatfraktion (gelöst in 2–3 ml 0,2M NaCl-Lösung) aufgetragen und mit 0,2M NaCl-Lösung eluiert. Die Proteinbestimmung erfolgte mit der Methode nach WEICHELBAUM (13) bzw. LOWRY (14). Die *Hyaluronidase*-Aktivität wurde durch Messung der freigesetzten N-Acetylglucosamin-Endgruppen bestimmt (15). Als Substrat dienten Hyaluronsäure und Chondroitin-6-Sulfat. Aktivitätsangabe in  $E_{546}$  nm/mg Protein/16 Stdn. Inkubationszeit bei  $37^{\circ}$ . Der Nachweis der  $\beta$ -*Glucuronidase*-Aktivität erfolgte an dem Substrat Phenolphthaleinglucuronid nach der Methode von BERNFELD und FISHMAN (16).  $1 \text{ mU} = 1 \mu\text{Mol}$  freigesetztes Phenolphthalein/mg Protein/Min. bei  $37^{\circ}$ . Zur Bestimmung der  $\beta$ -*Acetylglucosaminidase*-Aktivität wurde das Substrat  $\beta$ -Phenyl-N-Acetyl-D-glucosaminid verwandt (17).  $1 \text{ mU} = 1 \mu\text{Mol}$  freigesetztes Phenol pro mg Protein/Min. bei  $37^{\circ}$ . Die Aktivitätsmessung der sauren *Carboxypeptidase* erfolgte nach der bei STEIN, WEBER, REICH und BUDDECKE (18, 19) angegebenen Methodik. Als Substrat wurde L-Seryl-L-Leucyl-L-Leucin (Ser-Leu-Leu) verwandt. Die Bestimmung der *Carboxypeptidase-A*-Aktivität mit den beiden Substraten Benzoyloxycarbonyl-Glycyl-Phenylalanin (Z-Gly-Phe, Hersteller: Fa. Mann, New York) und Ser-Leu-Leu erfolgte wie die der sauren Carboxypeptidase;  $1 \text{ mU} = 1 \mu\text{Mol}$  freigesetztes Leucin bzw. Phenylalanin/mg Protein/Min. bei  $37^{\circ}$ . Die *Kathepsin*-Aktivität wurde mit denaturiertem Hämoglobin nach der Methode von ANSON (1) bestimmt;  $1 \text{ mU} = 1 \mu\text{Mol}$  freigesetztes Tyrosinäquivalent/mg Protein/Min. bei  $37^{\circ}$ .

## Ergebnisse

In Vorversuchen konnte durch unterschiedlich lange Lagerung verschiedener Tier-Organen bei Zimmer-

Kühlraum-, Gefrierschrank- und Brutschranktemperatur ein signifikanter Aktivitätsverlust für die Dauer der Lagerung der Leichen ausgeschlossen werden (21, 22.).

Tab. 1

*Hyaluronidase*-Aktivität (Extinktion/mg Protein bei 546 nm) in verschiedenen Organen des Menschen (Q + ♂). Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung.

Enzymkonzentration/Inkubationsmedium: 1,5 mg. Substratkonzentration: 2,5 mm Hyaluronat-Lösung. Inkubationszeit: 16 St. Inkubationstemperatur:  $37^{\circ}$ .

	Homogenat	Reinigungsschritt Fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung			
		0–10 Gew. %	11–30 Gew. %	31–50 Gew. %	51–80 Gew. %
Gehirn	0,01	—	0,05	0,03	—
Herz	0,005	—	0,004	—	—
Hoden	0,19	0,18	0,69	0,09	—
Hypophyse	0,09	—	0,22	0,09	—
Leber	0,50	0,25	0,83	0,04	—
Lunge	0,07	0,12	0,10	0,03	—
Lymphknoten	0,11	0,07	0,19	0,08	—
Milz	0,66	0,50	1,18	0,09	—
Nebenniere	0,08	0,02	0,24	0,01	—
Niere	0,24	0,24	0,33	0,04	0,07
Pankreas	—	—	—	—	—
Schilddrüse	0,01	—	0,09	—	—
Subcutanes Gewebe	0,02	—	0,06	—	—

Tab. 2

$\beta$ -*Glucuronidase*-Aktivität (mU/mg Protein) in verschiedenen Organen des Menschen (Q + ♂). Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung. Enzymkonzentration/Inkubationsmedium: 500  $\mu\text{g}$ . Substratkonzentration: 0,01 M Phenolphthalein-Glucuronid-Lösung. Inkubationszeit: 4 Stdn. Inkubationstemperatur:  $37^{\circ}$ .

	Homogenat	Reinigungsschritt Fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung			
		0–10 Gew. %	11–30 Gew. %	31–50 Gew. %	51–80 Gew. %
Gehirn	0,18	0,05	0,28	0,06	0,08
Herz	0,07	0,04	0,19	0,05	—
Hoden	1,20	0,62	3,00	0,02	0,49
Hypophyse	0,18	—	0,38	0,08	0,02
Leber	3,07	1,07	11,02	0,30	0,25
Lunge	0,59	0,47	1,60	—	—
Lymphknoten	0,19	0,09	0,74	—	—
Milz	3,00	0,64	7,40	—	—
Nebenniere	0,34	0,68	1,83	0,10	0,10
Niere	1,38	1,30	1,80	0,17	0,30
Pankreas	0,35	0,17	0,98	0,16	0,09
Schilddrüse	0,28	0,21	0,44	0,21	0,12
Subcutanes Gewebe	0,02	—	0,15	0,01	0,03

Tab. 3  
 $\beta$ -Acetylglucosaminidase-Aktivität (mU/mg Protein) in verschiedenen Organen des Menschen (♀ + ♂). Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung.  
 Enzymkonzentration/Inkubationsmedium: 500  $\mu$ g. Substratkonzentration 0,025 M  $\beta$ -Phenyl-N-Acetyl-D-Glucosaminid-Lösung. Inkubationszeit: 1 Std. Inkubationstemperatur: 37°

	Reinigungsschritt				
	Homogenat	0—10 Gew. %	11—30 Gew. %	31—50 Gew. %	51—80 Gew. %
Gehirn	30,18	8,57	49,85	9,85	9,59
Herz	12,27	2,58	34,08	5,42	—
Hoden	91,28	58,64	138,11	5,98	14,69
Hypophyse	17,84	—	64,89	25,29	17,70
Leber	29,53	31,20	119,72	20,52	—
Lunge	19,98	10,49	37,84	4,35	—
Lymphknoten	103,70	60,86	141,83	16,58	14,14
Milz	46,80	23,99	103,38	7,65	—
Nebenniere	93,54	47,11	151,64	25,12	5,15
Niere	66,47	39,76	118,89	38,85	17,90
Pankreas	21,75	27,73	112,42	42,86	3,86
Schilddrüse	7,49	0,40	13,63	4,53	—
Subcutanes Gewebe	4,87	—	18,27	4,00	9,20

Mit Ausnahme eines fehlenden Aktivitätsnachweises der *Hyaluronidase* im Pankreas konnten in allen untersuchten Organen die Aktivitäten der 5 lysosomalen Enzyme nachgewiesen werden. Mit Hilfe einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung (Tab. 1—3) wurden die höchsten Aktivitäten für alle untersuchten Enzyme — mit Ausnahme des Kathepsins — in der 11—30 Gew.-%-Fraktion gemessen. Über 60% der *Kathepsin*-Aktivität fand sich in der 31—50 Gew.-%-Fraktion. Ein Vergleich der Enzymaktivitäten der untersuchten Organe erfolgte daher in diesen Fraktionen (Abb. 2 u. 3). Die *Glycosidasen* Hyaluronidase,  $\beta$ -Glucuronidase und  $\beta$ -Acetylglucosaminidase zeigten die höchsten Aktivitäten in den Organen des retikulo-histiocytären Systems: Leber, Milz und Thymus. Auffällig sind die hohen Aktivitäten der  $\beta$ -Acetylglucosaminidase, der sauren Carboxypeptidase und des Kathepsins in der Nebenniere. Die dritthöchste Carboxypeptidase-Aktivität wurde in der Hypophyse gemessen und lag etwa doppelt so hoch wie in der Leber. Geringe Aktivitäten aller untersuchten Enzyme

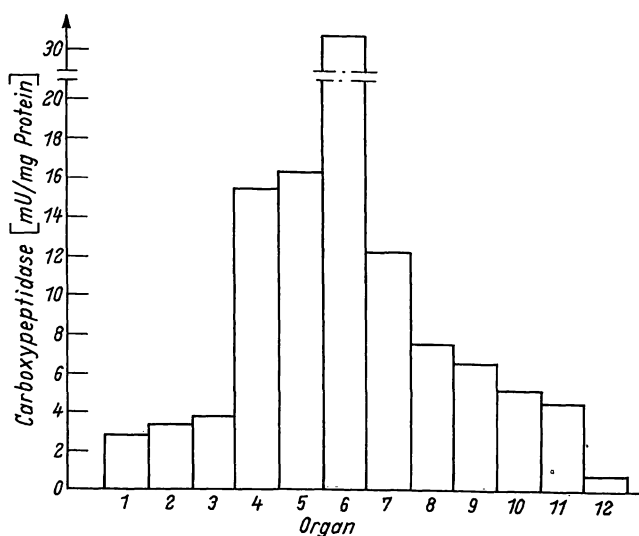


Abb. 2  
 Vergleich der sauren Carboxypeptidase-Aktivitäten (mU/mg Protein) verschiedener menschlicher Organe (♀ + ♂) in einer 11—30 Gew. %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung  
 (1. Lunge, 2. Gehirn, 3. Herz, 4. Hypophyse, 5. Pankreas, 6. Nebenniere, 7. Thymus, 8. Leber, 9. Niere, 10. Milz, 11. Schilddrüse, 12. subcutanes Bindegewebe)

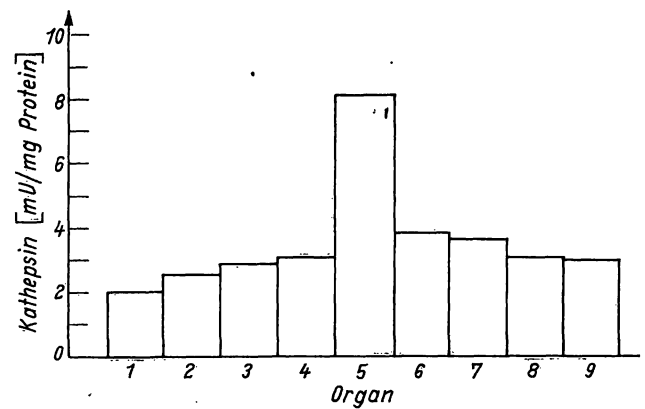


Abb. 3  
 Vergleich der Kathepsin-Aktivitäten (mU/mg Protein) verschiedener menschlicher Organe (♀ + ♂) in einer 11—30 Gew. %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung  
 (1. Lunge, 2. Gehirn, 3. Herz, 4. Milz, 5. Nebenniere, 6. Pankreas, 7. Leber, 8. Niere, 9. Thymus)

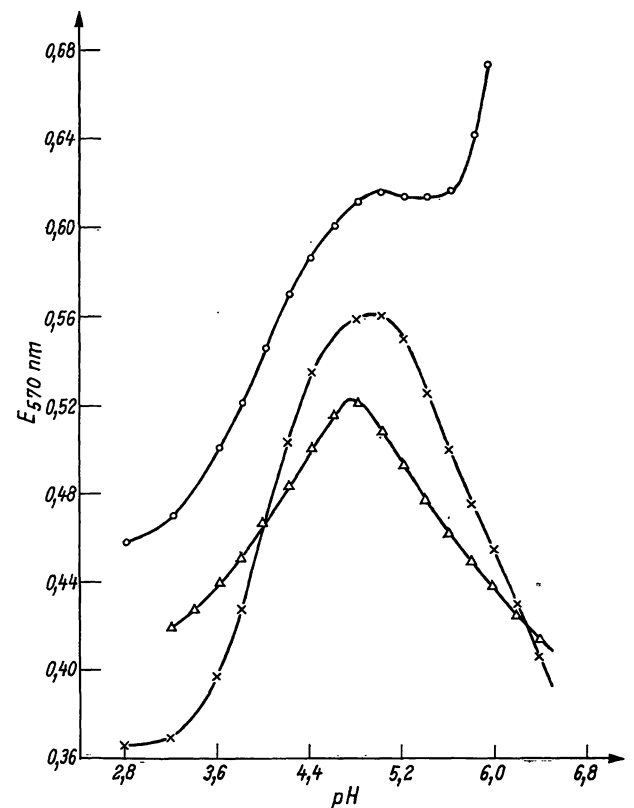


Abb. 4  
 pH-Aktivitätskurven der sauren Carboxypeptidase in verschiedenen Geweben (O = Pankreas, Δ = Leber, x = Herz) in 0,1 M Citrat-Puffer. Die Enzymkonzentrationen wurden jeweils nur für die Werte eines Organs mit gleicher Aktivität eingesetzt

zeigten die Organe: Gehirn, Herz und subkutanen Bindegewebe. In Abbildung 4 ist die Aktivität der sauren Carboxypeptidase in Pankreas, Leber und Herz in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgetragen. Dabei zeigt sich ein pH-Optimum zwischen pH 4,7 und 5,0. Im Pankreasgewebe steigt die Aktivitätskurve oberhalb pH 5,2 weiter an. Papierchromatographisch findet man oberhalb pH-Werten von 5,0 bis 5,2 freies Serin. Dies spricht für die Aktivität der Leucinaminopeptidase. Die Hydrolyse des Tripeptids Ser-Leu-Leu bei pH 4,8—5,0 kann im wesentlichen auf die Aktivität der sauren Carboxypeptidase zurückgeführt werden. Dies wird auch durch

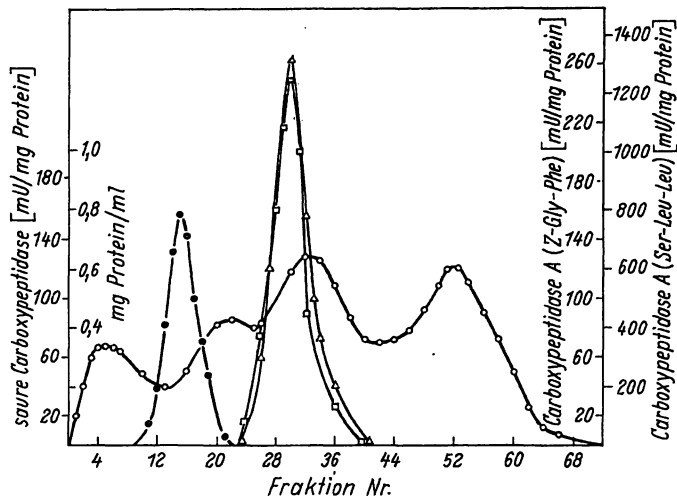


Abb. 5

Enzymaktivitäten (mU/mg Protein) von saurer Carboxypeptidase (•, Substrat: Ser-Leu-Leu, pH 4,5) und von Carboxypeptidase A (□, Substrat: Z-Gly-Phe und Ser-Leu-Leu, pH: 7,4 nach Gelfiltration der Ammoniumsulfatfraktion 11–30 Gew. % an Sephadex-G-150. Proteingehalt (○) in mg/ml (Extinktionsmessung bei 280 nm)

eine chromatographische Reinigung an Sephadex-G-150 veranschaulicht (Abb. 5). Dabei kommt es gegenüber der Aktivität im Homogenat zu einer 40fachen Anreicherung (Tab. 4). Im Bereich der bei pH 4,5 Ser-Leu-Leu spaltenden Carboxypeptidase werden bei gleichem pH-Wert in keinem meßbaren Umsatz die Substrate des Kathepsins A, der Carboxypeptidase A und der katheptischen Carboxypeptidasen: Z-Glu-Tyr und Z-Gly-Phe angegriffen.

Tab. 4

Reinigung der sauren Carboxypeptidase aus menschlichem Pankreasgewebe

Reinigung	spezif. Aktivität (mU/mg)	Anreicherung
Homogenat	3,9	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällung 11–30 Gew. %	16,0	4
Gel-Filtration an Sephadex-G-150 (Aktivitätsgipfel)	158,0	40

Da bei pH 7,4 im Bereich der sauren Carboxypeptidase kein Ser-Leu-Leu in meßbarer Größenordnung gespalten wird, kommt auch die Pankreascarboxypeptidase B für die Spaltung dieses Tripeptids nicht in Betracht. Mittels Papierchromatographie konnte die carboxylendständige Leucinabspaltung von Ser-Leu-Leu bei pH 4,5 — damit die Existenz der sauren Carboxypeptidase in menschlichen Geweben nachgewiesen werden. Auf Grund der Spaltung von Z-Gly-Phe bei pH 7,4 konnte die Pankreascarboxypeptidase A identifiziert und deutlich von der sauren Carboxypeptidase abgetrennt werden. Sie spaltet bei gleichem pH-Wert das Substrat Ser-Leu-Leu mit wesentlich höherer Geschwindigkeit als das Substrat Z-Gly-Phe. Der Nachweis erfolgt quantitativ nach der bei l. c. (18) angegebenen Methodik und qualitativ papierchromatographisch durch Identifizierung des abgespaltenen carboxylendständigen Leucin bzw. Phenylalanin. Gleichzeitig wird die Interferenz der Leucinaminopeptidase ausgeschlossen, da in diesem Bereich bei pH 7,4 kein aminoendständiges

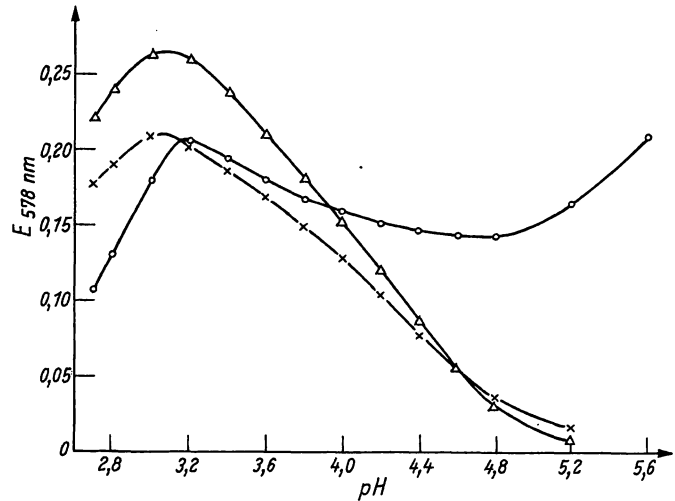


Abb. 6

pH-Aktivitätskurve des Kathepsins aus verschiedenen Geweben (○ = Pankreas, Δ = Leber, × = Herz). Inkubationsansätze mit 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer. Die Enzymkonzentrationen wurden jeweils nur für die Werte eines Organs mit gleicher Aktivität eingesetzt

Serin des Testsubstrates Ser-Leu-Leu in nachweisbarer Größenordnung abgespalten wird. Die pH-Optima des Kathepsins liegen in den untersuchten Geweben zwischen 3,0 und 3,5 (Abb. 6).

### Diskussion

Zur Aufrechterhaltung einer konstanten Mucopolysaccharid-Protein-Konzentration in menschlichen Geweben müssen Synthese- und Abbauvorgänge streng korreliert ablaufen. Mittels radioaktiv markierter Substanzen (<sup>35</sup>SO<sub>4</sub>, <sup>14</sup>C-Acetat, <sup>14</sup>C-Glucose, <sup>14</sup>C-Serin u. a.) konnten zahlreiche Schritte in der Synthese verfolgt werden (10, 11, 23). Von großem Interesse war sowohl das Verhalten beider Komponenten im Stoffwechsel als auch die Frage nach der an der Bindung zwischen Mucopolysacchariden und Proteinkomponenten beteiligten Substrate. Untersuchungen von GROSS, MATHEWS und DORFMAN (24) am Rippenknorpel von Ratten geben Hinweise dafür, daß der Mucopolysaccharid-Proteinkomplex als Einheit den Stoffwechselbedingungen unterliegt. Die Arbeiten von HILZ, KLEINE und KIRSIG (23) an Kälber-Rippenknorpel sprechen dafür, daß die Kettenverlängerung der Polysaccharidkomponente mit ihrer Sulfatierung gekoppelt ist. GREILING und STUHLSTZ (10) zeigten in „in vitro“-Versuchen an Rinder-Cornea, daß der Einbau von <sup>35</sup>SO<sub>4</sub> in Chondroitin-4-Sulfat vom Molekulargewicht und vom Sulfatierungsgrad abhängig zu sein scheint. SALMON und DAUGHADAY (25) konnten nachweisen, daß Aminosäuren die Aufnahme von Sulfat in Rippenknorpel stimulieren, — möglicherweise ein Hinweis dafür, daß für die Chondroitin-Sulfat-Synthese gleichzeitig die Synthese der Proteinkomponente nötig ist. Auf Grund der chemischen Analysen sehen GREILING und Mitarbeiter die Verknüpfung des Chondroitin-4-Sulfat-Peptids der Cornea in einer Bindung des Serins und des Threonins mit dem Galaktosyl-Xylosyl-Rest. Während für die Bindung von Chondroitin-4-Sulfat an Protein im Rindernasenknorpel von

